

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16389

研究課題名（和文）胆道癌に対する新規水溶性リンポルフィリン錯体を用いた光線力学的治療法の基盤研究

研究課題名（英文）Basic research on photodynamic therapy using novel water-soluble phosphor-porphyrin complexes for biliary tract cancer

研究代表者

山口 優也（YAMAGUCHI, Yuya）

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：60779966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、独自開発した水溶性リンポルフィリン錯体（Ptp）を用いた光線力学的療法（PDT）における胆道癌細胞株（NOZ）への細胞傷害作用の薬物動態および分子機構を明らかにした。Ptpの細胞内局在は、主にミトコンドリアへ集積することが分かった。さらに、Ptpを用いたPDTによる細胞死の形態は主にアポトーシスであった。アポトーシス誘導の分子機構は、Bax/Bcl-xL比の上昇によりCytochrome cが放出され、Caspase-3の活性化が誘導されることを明らかにした。本研究により、Ptpを用いたPDTが胆道癌に対して有用であることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道癌は早期発見が難しく、有効な化学療法も限られていることから難治性癌の1つとされている。近年、癌組織へ集積する光感受性物質を用いた光線力学的療法が新たな低侵襲癌治療法として注目されている。申請者らが開発した水溶性リンポルフィリン錯体が胆道癌細胞株に対して細胞傷害活性を示し、かつ従来の光感受性物質であるレザフェリンよりも低濃度（約1/200）で有効であった。本研究にて、その作用機序を解明したことにより、胆道癌への新たな有効物質の可能性の提供と今後の発展の礎を示すことが出来たと考える。

研究成果の概要（英文）：The present study elucidated the pharmacokinetics and molecular mechanism of the cytotoxic effect of a proprietary water-soluble phosphor-porphyrin complex (Ptp) on a biliary tract cancer cell line (NOZ) during photodynamic therapy (PDT). In addition, the main mode of cell death induced by PDT with Ptp was apoptosis. The molecular mechanism of apoptosis induction was revealed to be an increase in the Bax/Bcl-xL ratio, which induces the release of Cytochrome c and the activation of Caspase-3. This study suggests that PDT using Ptp is useful for biliary tract cancer.

研究分野：細胞生物学

キーワード：光線力学的療法 癌 アポトーシス ポルフィリン ミトコンドリア LED

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胆道癌は早期発見が難しく、化学療法も発展途上であることから、難治性癌の一つとされている。胆道癌は、外科的切除が最善であり、切除不能例では化学療法や放射線療法を用いる。しかし、高齢者では全身状態の不良とともに胆管炎や敗血症の併発頻度が高く、低侵襲な治療法が求められている。近年、光線力学的治療法 (Photodynamic therapy: PDT) は、低侵襲な癌治療として注目を集めている。PDT は、癌に集積性を示す光感受性物質と特定の波長による光照射による光化学反応を利用した局所的に癌細胞等の特定の細胞を傷害する目的で用いられ、正常組織への障害が非常に少ない低侵襲な治療法である。

現在、癌治療用の光増感剤である第二世代のレザフィリン®は、光線過敏症等の副作用が軽減しているが、癌細胞への選択性が不十分である等の問題は未解決である。したがって、難治性胆道癌に対する PDT の臨床応用の推進には、より高い治療効果と安全性の向上を示す新規の光感受性物質の開発が望まれている。

申請者らの研究グループは、これまでに新規光感受性物質として独自開発した水溶性リンポルフィリン錯体 (Ptp) が極めて低濃度 35nM (レザフィリン®の約 1/200) で癌細胞を傷害することを明らかにした (Matsumoto et al., Bioorg. Med. Chem., 2017)。本研究にて、Ptp の細胞内動態および Ptp を用いた PDT による作用機序を解明する。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、Ptp の細胞内動態、および Ptp を用いた PDT による胆道癌細胞への細胞傷害性の分子基盤を解明することである。さらに、胆道癌に対する独自に開発した Ptp を用いた PDT の有用性を提示することで新たな治療戦略への発展を築くことである。そのため、本研究では、Ptp の細胞内集積量と細胞内局在の解析、および細胞死の形態とその機序を明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

#### 1. Ptp の細胞内集積量および細胞内局在

Ptp の胆道癌細胞株 (NOZ) における細胞内集積量と細胞内局在を以下の方法で解析した。

##### 1-1) 細胞内集積量解析

NOZ へ Ptp 添加後、経時的 (1~24 時間後) に細胞株を回収して溶解することで Ptp の経時的な細胞内集積量の変化を分光光度計にて定量した。

##### 1-2) 細胞内局在解析

NOZ へ Ptp 添加 24 時間後の細胞内局在について、ミトコンドリア、リソソーム、小胞体、ゴルジ体に対する選択性蛍光プローブ (Mito Tracker Green, LysoTracker Green, ER-Tracker Green, NBD C8-ceramide) を用いた染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

#### 2. Ptp を用いた PDT による細胞死形態および分子機構の解明

本研究の PDT の実験条件は、光源として LED を用い、610nm の波長にて 30 分間照射した。この PDT 条件による NOZ に対する細胞死形態および分子機構の解明を目的として以下の方法にて解析した。

##### 2-1) 細胞死の評価

アポトーシスが誘導されているか、Annexin V-FITC と Propidium Iodide を用いたフローサイトメトリー法により評価した。また、アポトーシスの過程で生じる断片化 DNA について、TUNEL 法により評価した。

##### 2-2) アポトーシス誘導分子の評価

アポトーシス誘導分子である活性型 caspase3 の生成について、ウエスタンブロッティング法、免疫組織化学法を用いて評価した。

##### 2-3) ミトコンドリア関連アポトーシス制御分子発現

ミトコンドリア関連アポトーシス制御分子である Bcl-2 ファミリー分子 (アポトーシス促進分子 [Bax, Bak など]、アポトーシス抑制分子 [Bcl-2, Bcl-xL]) と Cytochrome C の発現について、ウエスタンブロッティング法と免疫組織化学法を用いて評価した。

#### 4. 研究成果

##### 1. Ptpp を用いた PDT は NOZ の生存率を低下させる

Ptpp を用いた PDT による NOZ の生存率は、Ptpp 10nM 以上で濃度および時間依存的に有意に低下した。24 時間後の IC50 は、35.5nM だった。

##### 2. Ptpp はミトコンドリアへ集積する

Ptpp の細胞内集積量を測定すると、投与後 1 時間から細胞内へ取り込まれることが確認でき、8 時間までに急速に細胞内蓄積量が増加した。その後 24 時間まで緩やかに増加していた。

Ptpp の細胞内局在を各種細胞小器官に対する選択性蛍光プローブで解析すると主にミトコンドリアに局在することが分かった。また、Ptpp がミトコンドリアへ集積することから PDT によるミトコンドリア膜電位への影響を JC-1 にて評価するとミトコンドリア膜電位が著しく低下していた。さらに、ATP の産生に關与する酸化的リン酸化 (OXPHOS の I, III, V) が PDT 後 6 時間からタンパクレベルで低下していた。

##### 3. Ptpp を用いた PDT はアポトーシスを誘導する

Annexin V-FITC と Propidium Iodide を用いたフローサイトメトリー法にて評価すると、PDT 後 6 時間から Annexin V 陽性細胞数が有意に増加し ( $27.1 \pm 6.6\%$ )、24 時間後には  $64.2 \pm 6.0\%$  まで増加し、細胞死の形態が主にアポトーシスであることが分かった。さらに、TUNEL 法にて、アポトーシスによる断片化 DNA が生じていることを確認した。

##### 4. Ptpp を用いた PDT はミトコンドリア関連アポトーシス分子 Bax/Bcl-xL 比を上昇させる

Ptpp を用いた PDT は、アポトーシス促進分子である Bax を上昇させ、抗アポトーシス分子である Bcl-xL を減少させることでアポトーシス促進へと傾向することが分かった。また、ミトコンドリア関連の他のアポトーシス促進分子 (Bak, Noxa, Bid) と抗アポトーシス分子 (Bcl-2) は、変化を示さなかった。さらに、アポトーシス誘導因子 (cytochrome c) および実行因子 (cleaved caspase-3) も有意な増加を示した。

以上より、本研究にて Ptpp は、ミトコンドリアへ集積し、PDT を行うことでミトコンドリアの機能的障害を引き起こし、アポトーシスを誘導する。その分子機構は、Bax/Bcl-xL 比の上昇に起因した cytochrome c の増加が cleaved caspase-3 の増加を導くことを明らかにした。本成果は、申請者らの開発した Ptpp を用いた PDT が胆道癌に対して有効である可能性を示唆する。この知見は今後の PDT を用いたがん治療の開発へ寄与されることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mai Nguyen Nhat Huynh, Yamaguchi Yuya, Chojookhuu Narantsog, Matsumoto Jin, Nanashima Atsushi, Takagi Hideaki, Sato Katsuaki, Tuan Le Quoc, Hishikawa Yoshitaka	4. 巻 53
2. 論文標題 Photodynamic Therapy Using a Novel Phosphorus Tetrphenylporphyrin Induces an Anticancer Effect via Bax/Bcl-xL-related Mitochondrial Apoptosis in Biliary Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 61～72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.20-00002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牧平広大, 田尻大海, 松本仁, Nguyen Nhat Huynh Mai, 山口優也, 菱川善隆, 今村直哉, 甲斐健吾, 七島篤志
2. 発表標題 軸配位子にグルコースを連結したリンポルフィリン錯体の光増感作用とPDT活性
3. 学会等名 2020年光化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nguyen Nhat Huynh Mai, 山口優也, Narantsog Chojookhuu, 松本仁, 七島篤志, 高木秀明, 佐藤克明, 菱川善隆
2. 発表標題 Photodynamic therapy by a novel porphyrin induces mitochondrial apoptosis in biliary cancer cells
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本 仁, 田尻大海, 牧平広大, Nguyen Nhat Huynh Mai, 山口優也, 菱川善隆, 今村直哉, 甲斐健吾, 七島篤志
2. 発表標題 軸配位子にグルコシル基を連結したリンポルフィリン錯体のPDT活性
3. 学会等名 第42回日本光医学・光生物学会 日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村直哉, 七島篤志, 甲斐健吾, 松本仁, 山口優也, 菱川善隆
2. 発表標題 新規ポルフィリン錯体化合物とLEDを用いた新たな光線力学的療法の胆管癌細胞株に対する有効性の検討
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ベトナム	Nong Lam University		